

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### A. Hasil Penelitian Terdahulu

Porfirin sebagai fotosensitizer generasi pertama diketahui mempunyai kelemahan pada  $\lambda_{\max}$  absorpsinya hanya 630 nm dengan absorptivitas kecil ( $10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) sehingga efek terapi dari penyinaran pada  $\lambda_{\max}$  tersebut hanya mencapai kedalaman 5 mm (Wöhrle *et. al.*, 1998). *Phthalocyanine* kemudian dikembangkan dari sintesis porfirin dengan penambahan 4 cincin pirol dengan ikatan nitrogen dan diketahui memiliki absorpsi daerah merah lebih tinggi sekitar 680 nm dan absorptivitas lebih tinggi ( $10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) namun kelarutan dalam air buruk dan dapat beragregasi yang berefek pada penetrasi sel dan menurunkan aktifitas fotokimianya (Allen *et. al.*, 2001). Penambahan logam pada struktur *phthalocyanine* menunjukkan peningkatan *Intersystem Crossing* (ISC), terutama logam diamagnetik seperti  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , dan  $\text{Al}^{3+}$  paling efektif dalam memproduksi triplet oksigen, namun kemampuan fluoresensi lebih kecil dibandingkan tanpa logam (Hirobarawiak *et. al.*, 2001). Porfirin dengan penambahan logam seng (Zn) diuji dan diketahui Zn dapat mengurangi sifat hidrofobik dan meningkatkan sifat hidrofilik porfirin (Hirobara *et al.*, 2004). Penambahan logam Zn dapat meningkatkan atau melemahkan *quantum yield* fluoresensi porfirin tergantung dari posisi pada strukturnya. Penambahan Zn juga tidak banyak berpengaruh pada ikatan dengan mitokondria sehingga diperkirakan dapat mengurangi akumulasi di mitokondria dan dapat meningkatkan ikatan pada membran biologis maupun sintetik yang membuatnya dapat meningkatkan efikasi dari terapi fotodinamik (Pavani *et al.*, 2009).

Tahun 2004, senyawa 5,10,15,20-*Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin tetrasodium salt* (TPPS) yang merupakan derivat porfirin diujikan pada pH berbeda menunjukkan afinitas TPPS dengan serum albumin (lipoprotein) lebih kuat pada sel kanker dengan pH lebih asam dibandingkan sel normal sehingga dapat meningkatkan lokalisasi dan akumulasi fotosensitizer, selain itu perbedaan

pH juga mempengaruhi spektrum UV-Tampak, nilai *quantum yield* singlet oksigen, dan fluoresensinya (Kubát *et. al.*, 2004). *Chlorin p6* juga pernah diujikan pada pH berbeda, dengan metode RNO menunjukkan nilai *quantum yield* singlet oksigen yang tinggi seiring pH yang semakin basa serta menunjukkan pada pH asam *chlorin p6* mengalami protonasi sehingga cenderung menjadi hidrofobik (Bose dan Dube, 2008).

## **B. Landasan Teori**

### **1. Kanker**

Kanker sering dikenal masyarakat sebagai tumor, walaupun tidak semua tumor adalah kanker. Ada dua golongan tumor yaitu tumor jinak dan tumor ganas. Tumor jinak tumbuhnya lambat dan berselaput pembungkus sehingga mudah dioperasi dan diangkat, tumor ganas atau kanker tumbuhnya cepat, tidak berselaput, tumbuhnya menyusup ke bagian lain melalui pembuluh darah dan pembuluh getah bening (Menkes RI, 2007). Kanker merupakan penyakit genetik yang disebabkan oleh mutasi, amplifikasi, delesi maupun ekspresi abnormal gen-gen yang berperan penting pada proses regulasi pertumbuhan sel. Abnormalitas genetik yang menginduksi terjadinya kanker ini bisa merupakan suatu pewarisan genetik maupun akibat perubahan sel-sel somatik setelah terpajan zat-zat karsinogenik. Pengobatan kanker yang sudah banyak diterapkan yaitu:

- a) kemoterapi menggunakan obat-obat kimia untuk menghentikan pertumbuhan sel, baik dengan membunuh sel secara langsung maupun dengan menghambat pembelahannya, namun kurang selektif sehingga sel normal yang berproliferasi tinggi juga diserang,
- b) pembedahan dengan mengambil massa tumor, meskipun cukup selektif pada jaringan kanker namun dapat menyebabkan kekambuhan bila masih ada sel kanker yang tertinggal,
- c) terapi radiasi dengan penyinaran sinar yang mempunyai energi tinggi yang dapat membentuk ion dalam sel-sel kanker yang menyebabkan mutasi sehingga sel mengalami kematian namun karena energinya yang tinggi sel normal dapat ikut terpapar (Fitriatuzzakiyyah *et. al.*, 2017),

d) terapi gen dengan menambahkan gen normal melalui vektor yang sesuai sebagai pembawa untuk melenyapkan sel-sel abnormal, metode ini selektif namun sistem genetik setiap orang yang berbeda menjadi hambatan efisiensi terapi ini (Syahrizal, 2008).

## 2. *Photodynamic Therapy (PDT)*

PDT adalah biner terapi yang melibatkan kombinasi cahaya tampak dan fotosensitizer. Setiap komponen tidak berbahaya secara tunggal, tetapi dalam kombinasi dengan oksigen molekuler, dapat menyebabkan generasi spesies oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species/ROS*), kerusakan sel oksidatif, dan kematian sel. Dualitas dari terapi ini mengarah pada selektivitas yang lebih besar terhadap menghancurkan jaringan yang sakit sejak sel terpapar oleh fotosensitizer, cahaya dan oksigen secara bersamaan menjadi sasaran agen sitotoksik yang dihasilkan selama PDT. Hal ini dapat menginduksi dua kali lipat selektivitas, karena ada pengambilan preferensi dari fotosensitizer oleh jaringan yang sakit serta kapasitas untuk membatasi aktivasi fotosensitizer ke tumor oleh membatasi penyinaran ke area tertentu. Dengan demikian, PDT memungkinkan untuk pemberantasan jaringan tumor secara eksklusif dan mencegah sel-sel sehat dari kerusakan (Allen *et al.*, 2001). Bagian penting dari ini adalah bahwa radiasi yang digunakan bukanlah energi yang tinggi, dan hampir tidak berbahaya untuk makhluk hidup (Bonnett, 2002). Keuntungan utama dari PDT lebih dari terapi kanker yang lain antara lain tingkat selektivitas akumulasi obat dalam jaringan tumor yang cukup signifikan, setiap komponen tidak toksis secara tunggal, senyawa fotosensitizer tidak toksik dalam gelap, kemampuan untuk menyinari hanya pada tumor, efektif mengeradikasi jaringan target tanpa meninggalkan bekas luka yang berarti, kemungkinan mengobati banyak lesi secara bersamaan, dan tidak ada morbiditas yang signifikan. Namun, kekurangannya terkadang timbul efek samping dan kemungkinan hasil *follow-up* jangka panjang yang tidak lebih baik dari pengobatan konvensional serta kurang *cost-effective* (Luksiene, 2003). Efek antitumor PDT berasal dari 3 mekanisme yang saling terkait: efek sitotoksik langsung sel tumor, kerusakan pada pembuluh darah tumor, dan induksi

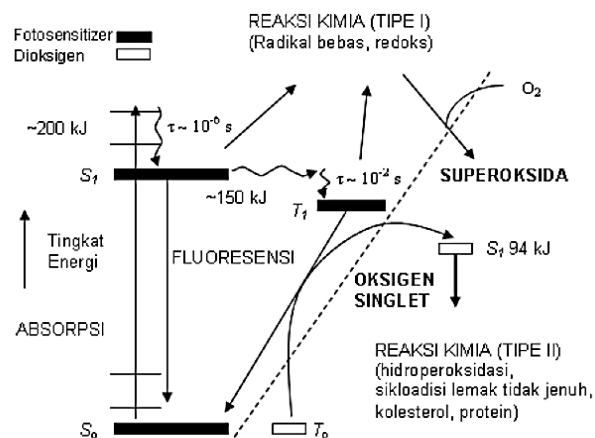
dari reaksi peradangan yang kuat yang dapat menyebabkan perkembangan kekebalan sistemik. Proses terapinya adalah fotosensitizer melokalisasi di jaringan kanker dan laser difokuskan pada lesi sehingga terbentuk ROS yang kemudian menginduksi apoptosis. Terapi fotodinamik laser saat ini terus dikembangkan karena bersifat noninvasif atau tanpa merusak jaringan sehat di sekitarnya. Terapi fotodinamik memberikan respon stress akut yang melibatkan kerusakan mitokondria, sitokrom C, dan mengaktivasi *caspases* (reseptor kematian) (Castano *et al.*, 2005). Selektivitas dari kerusakan tergantung pada dua faktor utama: selektivitas dari sensitizer untuk lokalisasi dalam tumor sehubungan dengan lokalisasi di jaringan normal, dan sifat terarah dari sinar (biasanya laser).

Salah satu keterbatasan PDT adalah sifat optik jaringan, yang mempengaruhi kedalaman penetrasi aktivasi cahaya serta intensitas cahaya yang bisa ditoleransi. Kedalaman penetrasi berlipat dari 4 mm diamati antara 500 dan 600 nm hingga 8 mm pada 800 nm, yang mendefinisikan kisaran 600-800 nm di mana cahaya penetrasi paling efektif. Efek biologinya masih bisa diamati pada 2-3 kali kedalaman  $1/e$  (sekitar 37% dari densitas cahaya), yang sesuai hingga 3-10% dari intensitas cahaya dan kedalaman penetrasi hampir 2,5 cm (Dougherty dan Marcus, 1992). Karena itu, ada sebuah jendela terapi 600-850 nm yang memungkinkan penetrasi cahaya ke dalam jaringan secara signifikan. Dalam jendela ini, panjang gelombang yang lebih panjang menembus lebih dalam karena mengurangi absorbansi jaringan dan mengurangi hamburan cahaya. Namun, untuk panjang gelombang lebih besar dari 850-900 nm, foton mungkin tidak memiliki cukup energi untuk berpartisipasi dalam fotokimia reaksi. Dengan demikian, tersedia panjang gelombang untuk fotodinamik sensitizers adalah 600-850 nm (sinar infra merah). Secara umum, penggunaan sensitizer dengan daya serap kuat (koefisien kepadaman besar) menawarkan kemungkinan untuk menyuntikkan dosis obat yang lebih kecil.

### **3. Mekanisme Fotodinamik**

Menurut Hamblin *et al.* (2013), ketika cahaya dengan dosis energi rendah diserap oleh jaringan hidup ada tiga interaksi yang mungkin terjadi. Pertama,

konversi internal di mana terjadi eksitasi elektron dan energi eksitasinya diubah ke dalam bentuk panas. Kedua, terjadi fluoresensi di mana absorpsi foton oleh molekul memicu emisi foton lain dengan panjang gelombang yang lebih besar. Ketiga, terjadi efek fotokimia yang mengakibatkan fotosensitizer tereksitasi ke keadaan singlet, kemudian mengalami *Intersystem Crossing* (ISC) membentuk fotosensitizer triplet. Fotosensitizer triplet ini memungkinkan transfer energi ke molekul oksigen membentuk ROS atau menyebabkan transfer elektron membentuk radikal anion yang menginduksi apoptosis. Kondisi triplet yang tereksitasi ini dapat berinteraksi dengan salah satu dari dua cara, didefinisikan sebagai Tipe I dan Tipe II yang tergambar pada diagram Jablonski (Gambar 2.1.) berikut.



**Gambar 2.1. Diagram Jablonski yang menggambarkan mekanisme fotofisika dan fotokimia terapi PDT**

Mekanisme Tipe I melibatkan atom hidrogen abstrak atau reaksi transfer elektron mengarah ke radikal bebas dan ion radikal yang dapat dengan mudah bereaksi dengan oksigen molekuler, menginduksi kerusakan sel oksidatif yang tidak dapat diperbaiki dan produksi ROS, yang dapat mengarah pada biologis lebih lanjut penghancuran. Selanjutnya autoksidasi dari fotosensitizer yang berkurang menghasilkan radikal anion superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Dismutasi atau satu pengurangan elektron dari O<sub>2</sub><sup>-</sup> memberikan hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), yang

dapat mengalami pengurangan satu elektron menjadi hidroksil oksidan yang kuat dan radikal non selektif ( $\text{HO} \bullet$ ). Di sisi lain, reaksi transfer energi ke molekul oksigen didefinisikan sebagai mekanisme Tipe II di mana fotosensitizer dalam keadaan triplet dapat meluruh tanpa radiasi ke keadaan dasar atau mentransfer energinya ke oksigen molekuler ( $\text{O}_2$ ), yang mengarah pada pembentukan  $^1\text{O}_2$ , dan reaksinya disebut sebagai proses Tipe II (Foote, 1968). Hasil dari kedua tahap tersebut yaitu spesies reaktif berupa singlet oksigen yang merupakan spesies zwitterionik dan mampu bereaksi dengan cepat dengan banyak substrat biologis, serta mampu menyebabkan kerusakan oksidatif yang penting dan akhirnya kematian sel terutama spesifik pada sel kanker. Pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) melalui Tipe II secara mekanis jauh lebih sederhana daripada melalui mekanisme Tipe I, dan kebanyakan fotosensitizer diyakini bekerja melalui Tipe II bukan mekanisme Tipe I.

#### **4. Senyawa Fotosensitizer**

Fotosensitizer adalah senyawa yang mampu menyerap cahaya panjang gelombang tertentu (kromofor) dan mengubahnya menjadi energi yang bermanfaat yang akan memproduksi agen sitotoksik mematikan. Untuk pengobatan kanker, fotosensitizer ideal harus memenuhi persyaratan berikut:

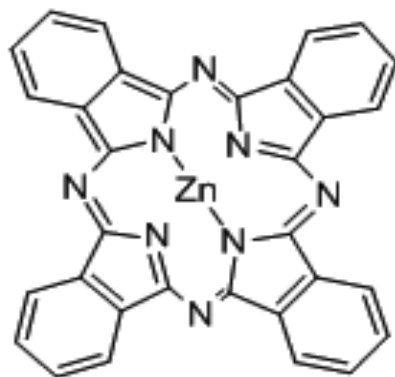
- a. memiliki absorbansi yang kuat dengan absorptivitas ( $\epsilon$ ) tinggi pada panjang gelombang yang lebih panjang (600-850 nm) di mana penetrasi jaringan cahaya maksimal dan masih cukup energik untuk menghasilkan  $^1\text{O}_2$ ,
- b. memiliki reaktivitas fotokimia yang sangat baik, dengan keadaan triplet tinggi ( $\sim r$ ) dan lama ( $\sim T$ ) serta dapat untuk secara efektif menghasilkan  $^1\text{O}_2$  dan spesies oksigen reaktif lainnya,
- c. memiliki toksisitas gelap minimal dan hanya menjadi sitotoksik di kehadiran cahaya,
- d. secara istimewa dipertahankan oleh jaringan target,
- e. cepat dikeluarkan dari tubuh, sehingga mendorong rendah toksisitas sistemik,
- f. secara kimiawi murni dan komposisi khusus diketahui (Maiya, 2000)

Selain memiliki aksi fototoksik, fotosensitizer juga memiliki kemampuan fluoresensi yang disebabkan oleh interaksi cahaya (foton) dengan elektron terluar dari molekul yang secara elektronik tereksitasi dengan penyerapan foton yang sesuai panjang gelombang. Molekul yang menggunakan jalur relaksasi ini secara efisien disebut fluorokrom yang menyerap cahaya dengan energi tinggi per foton dan memancarkan cahaya dengan energi lebih rendah per foton, menghasilkan pergeseran warna antara eksitasi dan cahaya fluoresensi (Jocham *et al.*, 2008). Kemampuan fluoresensi sangat bermanfaat karena dapat bersinar pada setiap tempat yang terdapat sel-sel ganas sehingga dapat dengan mudah mengarahkan bidang cahaya yang dibutuhkan untuk terapi (Wagnieres *et al.*, 1998). Tanda fluoresensi juga dapat digunakan sebagai biopsi optik untuk membandingkan penyakit ganas dan jinak tanpa membutuhkan evaluasi histologis (Svanberg *et al.*, 1998). Dengan fluoresensi juga dapat memperkirakan perbedaan dalam fluoresensi sebelum, selama, dan sesudah terapi serta bisa digunakan untuk mengevaluasi potensi keberhasilan atau kegagalan pengobatan (Braichotte *et al.*, 1996). Namun, jumlah fluoresensi dan PDT adalah kesatuan, jadi semakin kuat penanda fluoresen, agen PDT menjadi kurang aktif dan sebaliknya (Allison *et al.*, 2004).

##### **5. Senyawa Zinc Phthalocyanine (ZnPc)**

*Phthalocyanine* adalah porfirin sintesis, yang memiliki kelompok pyrol diperpanjang oleh kondensasi dengan cincin benzena ekstra, dan dijembatani oleh aza nitrogen. Sebagian besar *phthalocyanine* cenderung hidrofobik yang dapat membentuk agregat ketika dilarutkan air. Agregasi memfasilitasi konversi internal ke keadaan dasar yang menekan ISC (*Intersystem Crossing*). Oleh karena itu, *phthalocyanine* hidrofilik lebih disukai karena mereka terurai atau menghilang dari tubuh lebih cepat, yang menghasilkan lebih sedikit efek samping. Akibatnya, kelarutan air dapat meningkatkan bioavailabilitas dan distribusi *in vivo*. Namun kerugian dari *phthalocyanine* hidrofilik adalah penetrasi rendah dari senyawa ini melalui membran sel dibandingkan dengan *phthalocyanine* hidrofobik. Kehadiran substituen dan/atau konjugasi dengan pembawa dapat meningkatkan sifat

hidrofilik, termasuk penambahan logam pada inti *phthalocyanine* akan meningkatkan toksisitasnya pada PDT. Selain itu, penambahan logam juga dapat meningkatkan proses ISC. Pada penelitian sebelumnya diketahui penambahan logam *Zinc* dapat mengurangi sifat hidrofobik dan meningkatkan sifat hidrofilik porfirin (Hirobara *et al.*, 2004). Penambahan *zinc* juga dapat meningkatkan atau melemahkan *quantum yield* fluoresensi porfirin tergantung dari posisi pada strukturnya. *Zinc* tidak banyak berpengaruh pada ikatan dengan mitokondria sehingga diperkirakan dapat mengurangi akumulasi di mitokondria dan dapat meningkatkan ikatan pada membran biologis maupun sintetik yang membuatnya dapat meningkatkan efikasi dari terapi fotodinamik (Pavani *et al.*, 2009)



**Gambar 2.2. Struktur Zinc Phthalocyanine**

*Zinc phthalocyaninen* (ZnPc) adalah fotosensitizer lipofilik dengan  $\lambda$  maksimal 671 nm, koefisien kepunahan molar tinggi, seumur hidup triplet oksigen panjang, hasil oksigen singlet yang tinggi dan properti neon yang baik (Love, 1996). *Metalled-phthalocyanine* mempunyai  $D_{4h}$  simetris dan menunjukkan absorpsi kuat pada sinar tampak dan daerah infrared yang disebut pita Q sekitar 670 nm dan absorpsi lebih lemah di daerah UV atau disebut pita soret sekitar 330 nm. Pada inti ZnPc terdapat ion logam  $Zn^{2+}$  yang merupakan logam diamagnetik yang dapat menghasilkan triplet *yield* yang tinggi ( $\Phi_T > 0,4$ )

dengan masa tahan lama ( $t_T > 200$  ms) sehingga dapat menghasilkan singlet oksigen yang tinggi pula (Allen *et al.*, 2001).

## 6. Karakterisasi Senyawa Fotosensitizer

### a. Prediksi absorpsi

Kemampuan absorpsi senyawa terutama berdasarkan sifat lipofilisitasnya yang digambarkan dengan nilai  $\log P_{o/w}$  atau koefisien partisi. Nilai ini penting untuk mengetahui lipofilisitas yang mempengaruhi lokalisasi pada sel kanker dan hidrofilitas yang berpengaruh pada kecepatan eliminasi dari tubuh. Sifat senyawa fotosensitizer yang baik yaitu amfilik. Selain itu, sifat ini juga penting untuk menentukan pelarut atau metode dalam preparasi.

### b. Spektrum absorpsi

Pada spektrum sinar tampak, sekitar 400 nm terdapat pita yang kuat ( $\epsilon \sim 200000$ ) disebut pita soret, sedangkan di daerah 500-600 nm biasanya terdapat 4 pita yang berbeda, yang disebut pita Q ( $Q_4$ ,  $Q_3$ ,  $Q_2$ , dan  $Q_1$ ). Senyawa fotosensitizer yang mempunyai panjang gelombang besar 600-800 nm (pada pita  $Q_1$ ) diharapkan dapat bereaksi dengan sinar infra merah dengan jendela terapi 600-800nm.

### c. Absorptivitas molar ( $\epsilon$ )

Absorptivitas tergantung pada suhu, pelarut, struktur molekul, dan panjang gelombang radiasi. Berikut adalah persamaan hukum Lambert-Beer :

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad \dots\dots[R.1]$$

Keterangan :

A = Absorbansi

$\epsilon$  = absorptivitas

b = tebal kuvet (cm)

c = konsentrasi

Satuan ditentukan oleh satuan-satuan b dan c. Jika satuan c dalam molar (M) maka absorptivitas disebut absorptivitas molar disimbolkan dengan  $\epsilon$  dengan satuan  $M^{-1}cm^{-1}$  atau  $litermol^{-1}cm^{-1}$ . Jika c dinyatakan dengan persen berat/volume (g/100 mL) maka absorptivitas dapat ditulis dengan E dan juga

seringkali ditulis A (Gandjar dan Rohman, 2007). Nilai absorptivitas molar pada  $Q_1$  yang kecil menunjukkan bahwa butuh dosis fotosensitizer atau sinar yang besar untuk menghasilkan singlet oksigen (Bonnett, 2000).

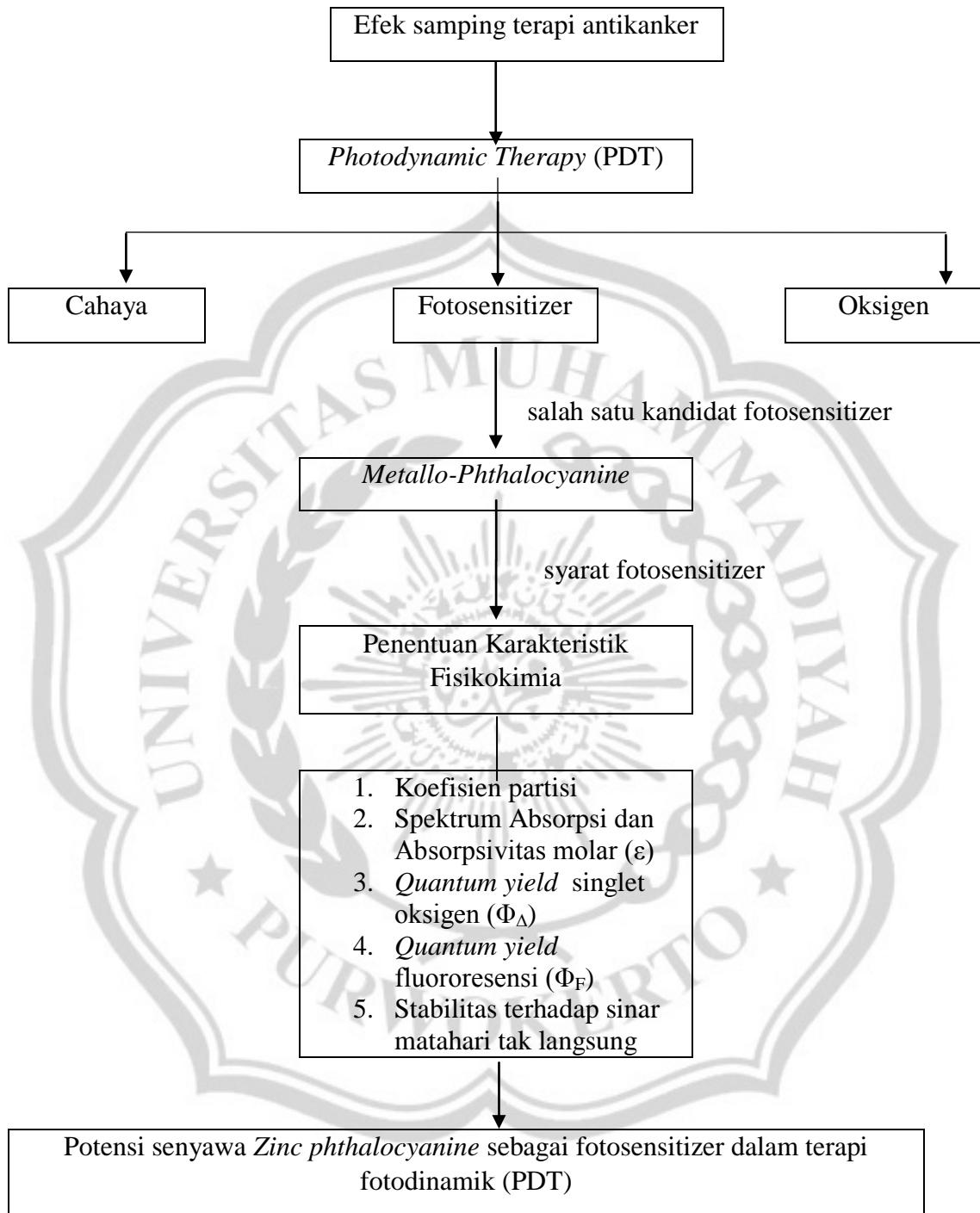
d. *Quantum Yield* Singlet Oksigen dan Fluoresensi

Singlet oksigen adalah molekul yang amat reaktif, elektrofilik, nonradikal dan ribuan kali lebih reaktif dibanding oksigen triplet. Perbedaannya dengan oksigen triplet digambarkan pada susunan elektronnya. Triplet oksigen mempunyai dua elektron terluar pada dua orbital terpisah. Sementara oksigen singlet, elektron terluarnya mempunyai spin berlawanan dan berpasangan (Raharjo, 2004). Efisiensi proses fotokimia diukur dengan *quantum yield* yaitu dengan mengkuantifikasi produk hasil yang terbentuk dalam reaksi dengan sejumlah cahaya. *Quantum yield* dari fluoresensi ( $\Phi_f$ ), fosforesensi ( $\Phi_p$ ), keadaan triplet ( $\Phi_\tau$ ), dan singlet oksigen ( $\Phi_\Delta$ ) sangat penting pada fotokimia. Nilai dari *quantum yield* adalah antara nol hingga satu. Dengan membandingkan nilai *quantum yield* singlet oksigen dan fluoresensi dapat ditentukan apakah senyawa lebih efektif untuk terapi saja atau efektif untuk deteksi (*photoimaging*) saja atau efektif untuk keduanya.

e. Stabilitas Senyawa Fotosensitizer

Senyawa yang memiliki kemampuan fotosensitizer cenderung tidak stabil terhadap cahaya atau mudah mengalami fotodegradasi. Fotodegradasi atau kerusakan yang diakibatkan oleh cahaya yang dipaparkan pada senyawa fotosensitizer dikhawatirkan dapat memberikan pengaruh terhadap efektifitasnya, karena fotosensitizer reaktif dengan cahaya. Pola spektrum menjadi parameter yang digunakan untuk mengetahui adakah perubahan yang terjadi setelah senyawa uji diberi paparan cahaya dilakukan selama 3,5 jam dengan selang waktu pengukuran tiap 30 menit pada suhu ruang. Senyawa uji dianalisis dengan spektrofotometer UV-Tampak pada lamda ( $\lambda$ ) pita  $Q_1$  (Christina *et al.*, 2008).

### C. Kerangka Penelitian



#### **D. Hipotesis**

Maiya (2000) menyebutkan struktur makrosiklik tetrapireol (pengembangan cincin benzene) akan menguatkan absorpsi pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) yang lebih panjang serta dengan adanya penambahan kation logam juga dapat meningkatkan ISC sehingga pembentukan singlet oksigen semakin efisien. Sehingga senyawa ZnPc memiliki karakteristik fisikokimia yang baik dan berpotensi sebagai fotosensitizer yang ideal untuk terapi fotodinamik.

